

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

## XP-002137295

AN - 1992-092889 [12]

AP - JP19900141976 19900531; [Previous Publ. JP4036180 ] ; JP19900141976 19900531

CPY - MEIP

DC - B04 D16

DR - 0009-S

FS - CPI

IC - C12N1/20 ; C12N1/38 ; C12P1/04 ; C12R1/01

MC - B02-Z D05-C

M1 - [01] M421 M720 M903 N131 Q233 V001

PA - (MEIP ) MEIJI MILK PROD CO LTD

PN - JP2991458B2 B2 19991220 DW200005 C12N1/20 005pp

- JP4036180 A 19920206 DW199212 005pp

PR - JP19900141976 19900531

XA - C1992-042907

XIC - C12N-001/20 ; C12N-001/38 ; C12P-001/04 ; C12R-001/01 ; (C12N-001/20 C12R-001/01)

AB - J04036180 Method comprises culturing lactic acid bacteria aerobically in a culture medium which contains (a) at least one of iron porphyrin, haem protein or animal tissue or blood contg. iron porphyrin; and (b) carbohydrate.

- The lactic acid bacteria is pref. a Lactococcus which can produce diacetyl.

- The microbe is e.g. Lactococcus lactis subsp. lactis OLS 3022 (FERM BP-11008). The substance (a) is added to a culture medium contg. 0.1-500 micro M iron porphyrin.

- USE/ADVANTAGE - By culturing lactic acid bacteria, various useful substances are produced together with lactic acid. As lactic acid accumulates and the pH of the culture medium falls, the multiplication of the bacteria and the prodn. of useful substances are suppressed. The new method uses a bacterium with high NADH oxidase activity and high diacetyl synthetase activity. The pyruvic acid formed is not converted to lactic acid and is converted to diacetyl. As a result, pH drop is suppressed and the microbe multiplies well and produces useful substances efficiently. (Dwg.0/0)

C - C12N1/20 C12R1/01

IW - INCREASE PRODUCE ANTIBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA CARBOHYDRATE IRON PORPHYRIN HAEM PROTEIN FORM DI ACETYL ACIDIC

IKW - INCREASE PRODUCE ANTIBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA CARBOHYDRATE IRON PORPHYRIN HAEM PROTEIN FORM DI ACETYL ACIDIC

NC - 001

OPD - 1990-05-31

ORD - 1992-02-06

PAW - (MEIP ) MEIJI MILK PROD CO LTD

TI - Increasing productivity of antibiotic from lactic acid bacteria - by including carbohydrate and iron porphyrin or haem protein, to form diacetyl without acidification

## ⑫ 公開特許公報(A) 平4-36180

⑤ Int. Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	⑬ 公開 平成4年(1992)2月6日
C 12 N 1/20	A	7236-4B	
1/38		7236-4B	
// C 12 P 1/04	A	9050-4B	
(C 12 N 1/20			
C 12 R 1:01)			

審査請求 未請求 請求項の数 4 (全5頁)

⑭ 発明の名称 乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法

⑯ 特 願 平2-141976

⑰ 出 願 平2(1990)5月31日

⑱ 発 明 者 金 子 勉 東京都東村山市栄町1丁目21番3号 明治乳業株式会社中央研究所内

⑲ 発 明 者 森 浩 晴 東京都東村山市栄町1丁目21番3号 明治乳業株式会社中央研究所内

⑲ 発 明 者 鈴木 英 毅 東京都東村山市栄町1丁目21番3号 明治乳業株式会社中央研究所内

⑳ 出 願 人 明治乳業株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番6号

㉑ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法

## 2. 特許請求の範囲

1. 鉄ポルフィリン、ヘム蛋白質、鉄ポルフィリンを含む動物組織及び血液の群から選ばれる成分の1種又は2種以上と糖源を含有する培地中で乳酸菌を好気条件下に培養することを特徴とする乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法。

2. 乳酸菌がラクトコッカス属に属するジアセチル生成能を有する微生物であることを特徴とする請求項1記載の乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法。

3. 鉄ポルフィリン、ヘム蛋白質、鉄ポルフィリンを含む動物組織及び血液の群から選ばれる成分の1種又は2種以上の培地中の濃度が鉄ポルフィリンとして0.1～500 $\mu$ Mであることを特徴とする請求項1又は2記載の乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法。

4. 培地中に鉄、銅及びモリブデンから選ばれる1種又は2種以上の金属の無機塩又は有機塩を含有し、且つ培地中の金属塩合計濃度が0.01～10mMであることを特徴とする請求項1～3記載の乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法に関するものである。

更に詳しくは、本発明は鉄ポルフィリン、ヘム蛋白質、鉄ポルフィリンを含む動物組織及び血液群から選ばれる成分の1種又は2種以上と糖源を含有する培地中で乳酸菌を好気条件下に培養することを特徴とする乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法に関するものである。

(従来技術)

乳酸菌の産生する抗菌性物質としては、ナイシン[J. Sci. Food Agric. 13, 22(1962)]、バクテリオシン[Appl. Environ. Microbiol. 45, 205(1983)]、

過酸化水素 [J. Dairy Sci. 63, 353(1979)]、シアセチル [Appl. Environ. Microbiol. 44, 525(1982)]、有機酸 [Appl. Environ. Microbiol. 54, 2179(1988)] 等が公知である。

特に、ナイシンに代表される抗菌性ペプチドはヒト由来のプロテアーゼにより容易に失活するため安全性が高いことから、各種の乳製品、肉製品及び缶詰のフルーツ、野菜等の保存剤として利用されている。

乳酸菌は培養過程で各種の有用物質と共に乳酸を生成し、培地中に次第に蓄積する乳酸によって微生物の増殖及び有用物質の産生が抑制されるという問題があり、この問題を解決する方法として、生成した乳酸を培地から除去する方法 (日本農芸化学会 1990年度大会 講演要旨集第 100頁) 及びアルカリ剤を添加して培地の pH を一定に保つ方法 [J. Milk Food Technol. 37, 107(1974)] 等が知られている。

しかしながら、これら従来の方法は操作が煩雑であるか又はアルカリ剤の添加により培地中の塩

濃度が著しく高くなる等の欠点があった。

(発明が解決しようとする課題)

本発明は、煩雑な操作やアルカリ剤の添加を必要とせず、糖源を含む培地に若干量の鉄ポルフィリンを添加し、好気条件下に培養するという簡単な方法によりビルビン酸からの乳酸生成を抑制し、乳酸菌の増殖性を高めると共に抗菌性物質の生産性を増大する方法を提供することを目的としてなされたものである。

(課題を解決するための手段)

本発明は鉄ポルフィリン、ヘム蛋白質、鉄ポルフィリンを含む動物組織及び血液の群から選ばれる成分の 1 種または 2 種以上と糖源を含有する培地中で乳酸菌を好気条件下に培養することの特徴とする乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法に関するものである。

上記乳酸菌としてはラクトコッカス属に属するシアセチル生産菌が用いられ、その具体例としてはラクトコッカス・ラクティス サブスペースス・ラクティス オーエルエス 3022 ((Giti') Lacto-

coccus lactis subsp. lactis OLS 3022) (微工研菌寄第 11008 号) が用いられる。

本願発明において用いる糖源は、乳酸菌が利用し得るものならば特に制限はされないが、グルコース、ラクトース等が好ましい。

添加物としては鉄ポルフィリン及び鉄ポルフィリンを含むヘム蛋白質が有効である。鉄ポルフィリンとしては例えばヘム、ヘミン、ヘマチンがあげられる。

ヘム蛋白質には、チトクロムオキシダーゼ、チトクロム、カタラーゼ、パーオキシダーゼ、ヘモグロビン等が含まれる。

鉄ポルフィリン、ヘム蛋白質、鉄ポルフィリンを含む動物組織、血液等は鉄ポルフィリンとして 0.1 ~ 500  $\mu$ M、望ましくは 0.5 ~ 5  $\mu$ M 添加すればよい。

さらに、金属塩の添加により効果を高めることが出来、鉄イオン、銅イオンならびにモリブデンイオンの一種又は二種以上を無機塩類または有機塩類の形で、これらの合計量が 0.01 ~ 10 mM 添加す

ればよい。

無機塩としては、例えば塩化物、硫化物であり、有機塩としては、例えば酢酸塩、乳酸塩である。

上記した鉄ポルフィリン又はヘム蛋白質、鉄ポルフィリンを含む動物組織、血液、ならびに金属塩は、あらかじめ培地を加熱滅菌した後に添加してもよいし、他の培地成分と同時に添加し、加熱滅菌してもよい。特にヘム蛋白質であるヘモグロビン、チトクロムオキシダーゼ、カタラーゼ、パーオキシダーゼは特定の酵素作用等により乳酸菌のシアセチルおよびアセトイン生産性を高めるのではなく、ヘム蛋白質の成分である鉄ポルフィリンの存在が乳酸菌のシアセチルおよびアセトイン生成能を著しく高めるからである。従って、前記したヘム蛋白質に比較し、安価な鉄ポルフィリンを含む動物の血液又は組織、例えば、肝臓、腎臓等又はこれらの抽出液を請求項 3 で示したように鉄ポルフィリンとして 0.1  $\mu$ M 以上培地に添加し、乳酸菌を接種し、振とうもしくはエアレーション等の好気条件下に培養することにより乳酸菌の

殖性及び抗菌性物質生産性を増大することが出来る。

以下、本発明の効果を発現する乳酸菌培養過程に於ける作用機序について説明する。

乳酸菌は培養過程でグルコース、ラクトース等の炭水化物(糖源)を代謝してビルビン酸を生成する。嫌気下では解糖系で生成したNADHを再酸化するため、生成したビルビン酸のほとんどを乳酸に変換する。

一方本発明の培養過程に於いては、供試菌NADHオキシダーゼ活性又はビルビン酸をシアセチルに変換するシアセチル合成酵素活性が著しく高くなり乳酸の生成が抑制される。その結果、本発明によれば乳酸菌の培養過程に於いて培地のpH低下は抑制され、微生物は盛んに増殖し、糖源の消費速度は著しく高く、消費される糖源の大部分はシアセチル及びアセトインに変換される。

これらのことは下記の試験例によって確認された。

試験例1(ヘミン添加及び振とう有無の効果試験)

第 1 表

シ ミ ク 系 ( $\mu$ M)	培 法	生 菌 数 (個/ $\mu$ l)	グルコース 消費量 ( $\mu$ M)	生 成 量 (mM)		抗菌活性 (mm)
				乳酸	7-アセチル アセトイン	
無し	静 置	$5 \times 10^4$	30	60	ND	13
	振 とう	$7 \times 10^4$	36	53	ND	14
0.01	静 置	$5 \times 10^4$	44	56	ND	14
	振 とう	$5 \times 10^4$	93	40	60	17

表中 ND は検出されなかったことを示す。

クエン酸塩を除くMRS培地及びこれにヘミン0.01mMを添加した培地を用意し、それぞれの培地に乳酸菌ラクトコッカス・ラクチスK-1を接種し、30℃で24時間静置及び振とう(120ストローク/分)の2種の条件下で培養した。培養終了後の各培地について生菌数(個/ $\mu$ l)、グルコース消費量(mM)、乳酸、シアセチル及びアセトインの生成量(mM)及び抗菌活性(生育阻止円径, mm)を測定し、それらの測定値とヘミン添加及び振とう有無の関係を評価した。

本試験の結果は第1表に示す。但し、抗菌活性はロイコノストック・メセンテロイデス(*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8293株を検定菌とするペーパーディスク( $\phi = 8$  mm)法による生育阻止円径で示し、抗菌活性を測定する際、培養液はいずれもpH4.8に調整して供試した。

(本頁以下余白)

第1表の成績から明らかなように、ヘミンを含む培地で乳酸菌を振とう培養(好気条件下で培養)すれば、生菌数が約10倍に増殖し、グルコースの消費量も多く、シアセチル、アセトイン及び抗菌活性成分の生成量が著しく増加した。

試験例2(ヘミン添加有無の経時的効果試験)

クエン酸を除くMRS培地(ペプトン 10g, ラブレムコ粉末 10g, イーストエクストラクト 5g, グルコース 20g, ツイーン80 1ml,  $K_2HPO_4$  2g, 酢酸ソーダ 5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  200mg,  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  50mg, 蒸留水 1000ml, pH6.5)及びこれにヘミン0.01mMを添加した培地を準備し、両方の培地に乳酸菌ラクトコッカス・ラクチス・サブスペシス・ラクチス3022(微工研菌寄第11008号)を接種し、30℃で振とう(120ストローク/分)条件下に培養し、培養開始時点、培養開始後12時間、24時間目、36時間目及び48時間目の5回培地をサンプリングし、各培地試料について、微生物の増殖性、シアセチル、アセトイン、乳酸及び酢酸の生成量、グルコースの消費量並びにpHを測定し、それらの測

定値とヘミン添加有無の関係を経時的に追跡し評価した。

本試験の結果は、増殖性、ジアセチル及びアセトインの生成量については第1図に示し、グルコースの消費量、pH、乳酸及び酢酸の生成量については第2図に示す。

第1図及び第2図の成績は、乳酸菌を好気条件下に培養（振とう培養）する場合、培地へのヘミンの添加が下記の効果を発現することを示した。

- 1) 乳酸菌の増殖性とグルコースの消費速度を著しく増大させる。
- 2) グルコース消費量に対する乳酸生成量の比率が低くなり、培地のpH低下が抑制される。
- 3) グルコースが全て消費されると生成した乳酸の消費が顕著となり、これに伴って、一旦低下したpHが上昇する。
- 4) ジアセチル及びアセトインの生成量が飛躍的に増大する。

なお、本試験に於いて、ジアセチル及びアセトインは本発明者等が先に報告した文献 [Agric.

Biol.Chem. 50, 2639(1986)]に記載の方法によって測定し、乳酸、酢酸及びグルコースは酵素法によって測定し、微生物の増殖性は培地の濁度( $\log_{10}$  OD<sub>550</sub> × 100)の測定によって求めた。

#### (実施例)

本発明の実施態様を具体的に説明するため、以下に実施例を示す。なお、以下の実施例に於いて、乳酸菌として、特に乳酸生成能の高いラクトコッカス属微生物を用いる例を示したが、本発明は実施例のみによって限定されるものではない。

#### 実施例1

クエン酸塩を除いたMRS培地100mlに0.1mM CuCl<sub>2</sub>を加え、121℃で15分間滅菌した。次に0.05Nに溶解したヘミンをろ過除菌後5μMになるように培地に加え、ナイシン生産菌のラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) K-1 スターターを1%接種し、30℃で120ストローク/分の条件で24時間振とう培養した。得られた培養液中の生菌数は $5 \times 10^8$  個/mlであり、培養液の抗菌活性をロイコノストック・メセンテロイデ

ス (*Leuconostoc mesenteroides*) ATCC 8293株を検定菌に用いるペーパーディスク法 ( $\phi = 8$  mm) により測定した結果生育阻止円径は15.5mmであった。

なお、比較のため、CuCl<sub>2</sub>及びヘミンを加えずに、30℃で24時間静置及び振とう培養し、培養液を上記と同様に測定した結果、いずれの場合も生菌数は $5 \times 10^8$  個/ml、生育阻止円径は13mmであった。

#### 実施例2

10%脱脂粉乳培地 100mlに0.1mM FeSO<sub>4</sub>、0.1mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>及びスラリー状にした牛肝臓100mgを加え121℃で10分間滅菌した。これにラクトコッカス・ラクティスK-1 スターターを1%接種し、30℃で120ストローク/分の条件で24時間振とう培養した。得られた培養液を実施例1と同様に測定した結果生菌数は $5.5 \times 10^8$  個/mlであり、生育阻止円径は16.0mmであった。

なお、比較のため、FeSO<sub>4</sub>、Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>及び牛肝臓を加えずに30℃で24時間静置及び振とう培養し、培養液を上記と同様に測定した結果、いずれの場

合も生菌数は $6 \times 10^8$  個/mlであり、生育阻止円径は13.5mmであった。

#### 実施例3

クエン酸塩を除いたMRS培地100mlを121℃で15分間滅菌した。次に0.05Nに溶解したヘミンを濾過除菌液10μMになるように培地に加え、ナイシン生産菌のラクトコッカス・ラクティス (*Lactococcus lactis*) K-1 スターターを1%接種し、30℃で125ストローク/分の条件で24時間振とう培養した。得られた培養液を実施例1と同様に測定した結果、生菌数は $4 \times 10^8$  個/mlであり、生育阻止円径は15.0mmであった。なお、比較のため、ヘミンを加えずに30℃で24時間静置及び振とう培養し、培養液を上記と同様に測定した結果、いずれの場合の生菌数は $5 \times 10^8$  個/ml、生育阻止円径は13mmであった。

#### (発明の効果)

本発明は乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法を提供するものである。

従来、乳酸菌は培養過程で各種の有用物質と共

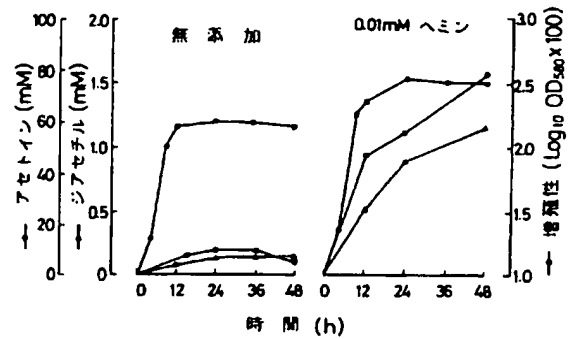
に乳酸を生成し、培地中に次第に蓄積する乳酸菌によって微生物の増殖及び有用物質の産生が抑制されるという問題があったところ、本発明により若干の鉄ポルフィリンと糖源を含有する培地中で好気条件下に乳酸菌を培養するという簡単な乳酸菌の増殖性及び抗菌性物質生産性の増大法が提供された。

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は、乳酸菌をヘミン添加培地及び無添加培地で好気条件下に培養した場合の微生物の増殖性（培地の濁度）、シアセチル及びアセトインの生成量を経時的に測定した値を示す図であり、第2図は、第1図の場合と同様な方法で培養した培地について、グルコースの消費量、pH、乳酸及び酢酸の生成量を経時的に測定した値を示す図である。

出願人 明治乳業株式会社  
代理人 弁理士 平 木 祐 輔  
同 弁理士 石 井 貞 次

### 第 1 図



### 第 2 図

